

明 細 書

新規な神経幹細胞マーカー

技術分野

- [0001] 本発明は、複数の細胞種から構成される組織あるいは細胞集団から、神経幹細胞／前駆細胞を検出する方法に関する。また、本発明は、複数の細胞種から構成される組織あるいは細胞集団に対して、分化を誘導する過程または操作を施した時に神経幹細胞／前駆細胞の形質を維持させること、あるいは、分化した神経細胞の集団に対して神経幹細胞／前駆細胞を誘導することが可能な、薬剤、操作等のスクリーニング法に関する。

背景技術

- [0002] 従来、損傷を受けた中枢神経系は、神経機能を司るニューロン自身に分裂能がないために機能修復が不可能であると考えられていた。しかし、近年、成体・成人の中枢神経系においても自己複製能、多分化能ともに有する神経幹細胞が存在することが明らかになり、中枢神経系においても幹細胞から機能する細胞、組織を分化させることにより損傷された組織、臓器を補完する、いわゆる再生医療の可能性が現実的なものとなってきた(非特許文献1)。また、神経幹細胞が見出されたことにより、神経幹細胞に作用して、ニューロンやグリア等の機能する神経細胞に分化させる薬剤をスクリーニングすることも可能となった(非特許文献2)。
- [0003] 脊髄損傷をはじめパーキンソン病やアルツハイマー病等の中枢神経系の疾患に対する治療法は様々なものが試みられているが、これらの疾患を完治できる治療法は、現在のところ見出されていない。しかし、中枢神経系に対する再生医療や、神経幹細胞から機能する神経細胞への分化を誘導する薬剤は、中枢神経系の疾患の根本的な治療法をもたらすことになるが、これらのことを可能にするためには、何らかのマーカーを用いて神経幹細胞を分離することが必須である。中枢神経系においてはNestinやMusashi1、 α -チューブリン等の神経幹細胞マーカー遺伝子が既に同定されている(非特許文献3及び4)。これらの遺伝子を用いることにより神経幹細胞／前駆細胞を同定することは基本的には可能であるが、各遺伝子ともマーカーとしての機能

に一長一短がある。

[0004] 非特許文献1:Reynolds, B. A. et al. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. J. Neurosci. 12:4565-74

非特許文献2:Roy, N. et al. (2000) In vitro neurogenesis by neural progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat. Med. 6:271-77

非特許文献3:Keyoung H. M. et al. (2001) High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal brain. Nat. Biotech. 19:843-50

非特許文献4:Miller F. et al. (1987) Isoforms of alpha-tubulin are differentially regulated during neural maturation. J. Cell. Biol. 105:3065-73

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、新たな神経幹細胞マーカーを見出して、複数の細胞種から構成される組織あるいは細胞集団から神経幹細胞／前駆細胞を検出する方法、さらには、神経幹細胞／前駆細胞を選別する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決するために、本発明者らはNC1遺伝子に注目した。NC1遺伝子は、家族性持続性過インスリン性低血糖症(persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy;PHHI)患者の膵臓に特異的に発現している遺伝子として見出されたものであるが、正常組織においては、脳で特異的に発現している遺伝子であることが示されている。本発明者らは、さらに詳細にNC1遺伝子の機能を検討し、以下に述べる方法により、この遺伝子が神経幹細胞／前駆細胞の検出手段として機能することを見出した。

[0007] 神経幹細胞は、増殖し継代を繰り返すことができる(自己複製能)と同時に、ニューロンやグリア細胞等の中枢神経系を構成する細胞を作り出すことのできる(多分化能)

未分化な神経系の細胞として定義される。神経幹細胞／前駆細胞の選択的培養法(neurosphere法)は、Weissらによって確立されている(Science, 255, 1707(1992))。Weissらの方法は、マウス胎生期脊髄や線条体より得た神経幹細胞／前駆細胞を含む中枢神経系の細胞群を、EGF(epidermal growth factor)またはFGF2(fibroblast growth factor 2)を加えた無血清培地で培養すると、多くの細胞は無血清の環境下で障害されるが、神経幹細胞／前駆細胞はこの培養条件で増殖し、細胞塊(neurosphere)を形成して浮遊するというものである。

[0008] 本発明者らは、ヒト胎児の脊髄及び前脳から調製した細胞からneurosphereを形成させ、それを血清存在下で培養することによりニューロンやグリア細胞に分化させる系を確立している。この系を用いてNC1遺伝子の発現を検討したところ、後述のように、neurosphereの状態、即ち神経幹細胞／前駆細胞ではその発現は高く、ニューロンやグリア細胞への分化に伴って発現が低減することを、今回初めて見出した。このことから、新たな神経幹細胞マーカーとしてNC1遺伝子を利用し、NC1遺伝子の発現を指標にして神経幹細胞／前駆細胞を検出し、神経幹細胞／前駆細胞を選別することを可能とし、本発明を完成するに至った。

[0009] 即ち、本発明は、NC1遺伝子の発現を検出するために用いることのできる配列番号1〜3の塩基配列を有するDNAに関する。つまり、配列番号1に記載の塩基配列全部または一部を有するDNA;配列番号2または配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAである。

また、本発明は、NC1遺伝子産物と特異的に反応し、NC1遺伝子の発現を検出するために用いることのできる抗体のエピトープとなる配列番号4〜6のアミノ酸配列を有するペプチドに関する。つまり、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するペプチド;配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するペプチド;配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するペプチド;上記いずれかのペプチドを抗原として得られた抗体;抗体の種類がポリクローナル抗体である上記抗体;抗体の種類がモノクローナル抗体である上記抗体である。

さらに、本発明は、上記DNA、ペプチド及び抗体からなる群より選ばれる少なくとも1種を用いてNC1遺伝子の発現を検出する方法、並びに、NC1遺伝子の発現を指標

に神経分化因子等として機能する薬剤をスクリーニングする方法に関する。つまり、上記DNA、ペプチド及び抗体からなる群より選ばれる少なくとも1種を用いた神経幹細胞／前駆細胞の検出方法；上記検出方法を用いた、神経分化因子または神経分化抑制因子として機能する薬剤をスクリーニングする方法である。

[0010] まず、本発明の神経幹細胞／前駆細胞の検出方法について説明する。

本発明の神経幹細胞／前駆細胞の検出方法は、配列番号1〜3のいずれかの塩基配列を有するDNA、配列番号4〜6のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、及び当該ペプチドを抗原として得られた抗体のうちの少なくとも1種を用いるものである。

[0011] 本発明において対象とする神経幹細胞／前駆細胞は、試験管内または生体内でニューロンやグリア細胞等の機能を有する神経細胞に分化するものであれば、動物種、形態、発生段階等は特に限定されるものではない。望ましくは哺乳動物由来であり、さらに臨床応用上の観点からヒト由来であることが望ましい。

[0012] ある組織や細胞等に目的の遺伝子が発現していることを検出する方法としては、例えばノーザン法等がある。

後述のように、NC1遺伝子が神経幹細胞／前駆細胞で高い発現を示すことから、ノーザン法を用いて、例えば、配列番号1に記載の塩基配列全部または一部を有するDNAをプローブとして、生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。なお、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAは、PCR等により得ることができる。

プローブとして用いるDNAは、配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAに限定されるものではなく、NC1遺伝子由来のmRNAを特異的に認識するものであれば全てプローブとして利用することができる。

[0013] プローブの標識物質としては、 ^{32}P 、 ^{35}S 等の放射性物質；アルカリ性ホスファターゼ、ホスラディッシュ・パーオキシダーゼ等の酵素；フルオロセイン・イソチオシアネート等の蛍光物質等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

プローブの標識方法としては、酵素的に結合させる方法、化学的に結合させる方法、さらに後述の実施例1で用いたような試験管内転写系による方法等が挙げられるが、

特にこれらの方法に限定されるものではない。

- [0014] また、目的の遺伝子が発現していることを検出する方法も、ノーザン法に限定されるものではなく、例えばRT-PCR法やプライマー・イクステンション法等によっても、同様のことを行うことができる。

RT-PCR法やプライマー・イクステンション法を用いる場合、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA、配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAをプライマーとして用いることができる。なお、配列番号2及び3に記載の塩基配列を有するDNAは、それぞれDNA合成により得ることができる。

プライマーとしては、これらに限定されるものではなく、NC1遺伝子由来の塩基配列と見なされる塩基配列を有するDNA断片を増幅する、あるいは、NC1遺伝子の転写産物を特異的に認識するものであれば、全てプライマーとして利用することができる。

- [0015] また、ある細胞に目的のタンパク質が存在することを検出する方法としては、例えばウェスタン法等があるが、NC1遺伝子の遺伝子産物と特異的に反応する抗体を用いて、生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。

- [0016] このような抗体を作製するためには、抗原となる蛋白質またはペプチドを作製する必要がある。NC1遺伝子産物は247アミノ酸から成る蛋白質であるが、抗原となる蛋白質を作製することは、遺伝子工学的手法を用いるとしても作製工程が若干複雑になる。そこで、本発明者らは、作製の容易なペプチドを抗原として用いることとし、アミノ酸の疎水性度や塩基性度等からエピトープとなりうる可能性のあるアミノ酸配列を有するペプチドとして、配列番号4-6に記載のアミノ酸配列を有するペプチドを選択した。

ただし、NC1遺伝子産物と反応する抗体を作製するための抗原としては、ここで記載したペプチドに限定されるものではなく、247アミノ酸から成るNC1遺伝子産物の全部または一部を用いてもよい。

さらに、抗原の作製や精製を容易にするために、タグ配列として機能するFLAGやMycペプチドのような、NC1遺伝子産物以外のアミノ酸配列を含む蛋白質またはペプ

チドを抗原とすることも可能である。

また、配列番号4〜6に記載のアミノ酸配列を有するペプチド等の、本発明で抗原として用いたペプチドは、ペプチド合成装置を用いて固相法により合成したが、合成の方法や形態、装置等は特に限定されない。

[0017] 上記NC1遺伝子産物と反応する抗体としては特に限定されず、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の作製方法としては、従来公知の方法を使用することができる。

[0018] 目的のタンパク質が存在することを検出する方法として、ウェスタン法の他にも組織免疫染色法や免疫沈降法等があるが、このような方法によっても、NC1遺伝子産物を認識する抗体を用いて、生体組織あるいは複数の細胞種から成る細胞集団において神経幹細胞／前駆細胞を検出することが可能である。

[0019] 次に、本発明のスクリーニング方法について説明する。

本発明の神経分化因子または神経分化抑制因子として機能する薬剤をスクリーニングする方法は、上記神経幹細胞／前駆細胞の検出方法を用いるものである。

つまり、本発明の上記神経幹細胞／前駆細胞の検出方法を利用することにより、例えば次のような方法で、神経分化因子または神経分化抑制因子等として機能する薬剤をスクリーニングすることができる。

[0020] 神経幹細胞／前駆細胞を含むneurosphereは、血清等の刺激によりニューロンやグリア細胞等の神経細胞に分化する。このような神経細胞を分化させる培養系に、神経分化因子または神経分化抑制因子等として機能する薬剤の候補となる物質、あるいはそれらが含まれる可能性のある抽出物等を添加し、本発明の上記検出方法を用いて、培養系に含まれる神経幹細胞の数、あるいは神経幹細胞マーカーであるNC1遺伝子の発現の強弱等を指標に、目的の活性を有する薬剤をスクリーニングすることができる。

[0021] 神経細胞を分化させる培養系としては、neurosphereの系が最も適当であるが、分化に伴ってNC1遺伝子の発現が変化するような培養系であれば、特に限定されるものではない。

また、神経分化因子または神経分化抑制因子等として機能する薬剤の候補となる物

質、あるいはそれらが含まれる可能性のある抽出物等としては、化学的に合成された化合物、微生物や培養細胞の培養液、生物の個体あるいは組織の抽出物等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

発明の効果

- [0022] 本発明のNC1遺伝子及びNC1タンパク質は、神経系の細胞の分化過程に関与していると考えられ、神経幹細胞／前駆細胞を検出、選別できる神経幹細胞マーカーとして応用できる。

発明を実施するための最良の形態

- [0023] 以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

- [0024] (実施例1)ノーザン法によるNC1遺伝子発現の検出

ノーザン法によりNC1遺伝子の発現を検出するために以下の実験を行った。

- [0025] (1)検出用プローブの調製

遺伝子発現の検出に用いるプローブは、NC1遺伝子に相当するDNA断片を組み込んだベクターを用いた試験管内転写系により作製した。具体的には、以下に示す方法によった。プライマーとして配列番号2に記載されている塩基配列及び配列番号3に記載されている塩基配列にXhoI部位を付加したオリゴヌクレオチドを用いた。鋳型は、CLONTECH社製のヒト胎児cDNAライブラリーの一部を熱処理し、遠心により残渣を沈殿させた上清を用いた。上記プライマーと鋳型を用い、PCRによりNC1遺伝子特異的配列を有するDNA断片を増幅した。これをXhoIで切断した後、ベクター(Promega社製、pGEM-T Easy)にサブクローニングした。このベクターには、プローブ断片として配列番号1に記載されている塩基配列が含まれることになる。このベクターを用いて試験管内転写系により、DIG-11-UTP(Roche Molecular Biochemicals社製)標識RNAプローブを作製した。

- [0026] (2)神経幹細胞／前駆細胞の培養と分化誘導

ヒト胎児前脳及び脊髄から組織片を採取し、neurosphere培養法(Reynolds, B. A. et al., (1992)J. Neurosci. 12:4565-74; Vescovi, A. L. et al., (1993)Neuron 11:951-66; Reynolds, B. A. and Weiss, S., (1996)Dev Bi

ol. 175:1-13)を用い、ヒト神経幹細胞／前駆細胞から成るneurosphereを培養した。培養法の詳細は、金村らの方法(Kanemura, Y. et al., (2002)J. Neurosci. Res. 69:869-79)に従った。

[0027] 底面積75cm²の細胞培養用フラスコあたり3×10⁶個の細胞を4日間前培養した後、遠心し、レチノイン酸及び1%ウシ胎児血清を添加した培地に再懸濁した。培養開始後7日目に新鮮な培地に交換し、14日目まで培養を続けた細胞を分化誘導群Aとした。また、同様に4日間の前培養を行った後、ウシ胎児血清の最終濃度を10%にした培地中で細胞を増殖させ、2回の継代を経てコンフルエントに達するまで培養を続けた細胞を分化誘導群Bとした。

[0028] (3)ノーザン法

neurosphereを構成する細胞、分化誘導群A及びBから全RNAを抽出し、その1μgを1%ホルムアミドを含有するアガロースゲルに展開した後、ナイロンメンブレン(Hybond-N; Amersham Bioscience社製)に転写した。RNAを転写したメンブレンと(1)で作製した標識RNAプローブを、DIG Easy Hyb Buffer(Roche Molecular Biochemicals社製)中、68℃で1晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを洗浄し、Anti-Digoxigenin-AP、Fab Fragment(Roche Molecular Biochemicals社製)と反応させ、CDP-Star chemiluminescent substrate(Amersham Bioscience社製)により、NC1遺伝子発現の検出を行った。

[0029] (4)結果

上記(1)～(3)の材料と方法により、ヒト神経幹細胞／前駆細胞及び分化を誘導した細胞におけるNC1遺伝子の発現を検討した。図1はその解析結果を示したものである。なお、図1において、「NC1」はNC1遺伝子由来mRNAの易動度に相当する位置を示し、「28S rRNA」は28SリボゾームRNAの易動度に相当する位置を示す。「BXPC3」はヒト膵臓癌由来細胞株BXPC3を、「NTERA-2」はヒト胎児性カルシノーマ由来細胞株NTERA-2を、「Jurkat」はヒトT細胞株Jurkatを、「U251」はヒトグリオブラストーマ由来細胞株U251を示す。

[0030] ヒト胎児組織から調製したneurosphereは、神経幹細胞／前駆細胞から成る。また、

分化誘導群Aは、ニューロンの形質を有するチューブリン B III陽性細胞及びアストロサイトの形質を有するGFAP (glial fibrillary acidic protein) 陽性細胞から成り、分化誘導群Bでは、ほぼすべての細胞がGFAP陽性細胞から構成される。これらの培養系におけるNC1遺伝子の発現は、neurosphereでは顕著に高く、分化誘導群A及びBではともに低い発現しか見られなかった(図1)。この結果は、NC1遺伝子の発現が、神経幹細胞／前駆細胞で高く、ニューロンやアストロサイトへの分化に伴って発現が低下することを示すものである。このように、NC1遺伝子が神経幹細胞／前駆細胞で特異的に高い発現を示すことから、この遺伝子を神経幹細胞マーカーとして応用できることが示された。

[0031] (実施例2) ウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出

ウェスタン法によりNC1遺伝子産物を検出するために以下の実験を行った。

[0032] (1) NC1遺伝子産物に対する抗体の作製

NC1遺伝子がコードするタンパクの部分ペプチドを抗原として、NC1遺伝子産物に反応する抗体を作製した。実際には、NC1遺伝子産物の部分ペプチドである配列番号4に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、ウサギに免疫して抗血清を得た。この抗血清が元のペプチドと1万倍以上のタイターで反応することをELISAで確認し、NC1遺伝子産物に対する抗体を含む抗血清とした。

[0033] (2) 供試細胞と細胞抽出液の調製

実施例1でNC1遺伝子の発現が検出されたヒト胎児神経組織から調製したneurosphereに対して、(1)で作製した抗血清を用いた、ウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出を検討した。また、NC1遺伝子の発現が検出されなかったJurkat細胞及びJurkat細胞にNC1遺伝子発現ベクターを導入した形質転換株についても同様に、ウェスタン法によるNC1遺伝子産物の検出を試みた。これらの細胞から全細胞抽出液を調製し、さらにN-EXTRACTキット(SIGMA社製)を用いて、細胞質画分と核画分を調製した。

[0034] (3) ウェスタン法

(2)で調製した試料を95℃で5分間加熱後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、ニトロセルロースメンブランに転写した。メンブランはブロッキング液(5%

スキムミルク、0.1%Tween-20を含有するトリス緩衝液)でブロッキングした後、(1)で作製した抗血清を添加した。メンブランを洗浄した後、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼで標識した抗ウサギIgG抗体(Amersham Bioscience社製)を反応させ、ECL(Amersham Bioscience社製)を用いて、反応する画分を検出した。

[0035] (4)結果

上記(1)～(3)の材料と方法により、作製した抗血清によるNC1遺伝子産物の検出を検討した。その結果を図2、3に示す。なお、図2において、レーン1はJurkat細胞由来の全RNAを、レーン2はNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の全RNAを電気泳動したものである。また、図3において、レーン1はNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の全細胞抽出液を、レーン2はNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の細胞質画分を、レーン3はNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の核画分を電気泳動したものであり、レーン4はneurosphereの全細胞抽出液を、レーン5はneurosphereの細胞質画分を、レーン6はneurosphereの核画分を電気泳動したものである。

[0036] 上記抗血清は、NC1遺伝子を発現していないJurkat細胞とは反応しない(図2、レーン1)が、Jurkat細胞にNC1遺伝子を強制発現させた形質転換株(Jurkat-NC1)とは反応し、NC1遺伝子産物に相当するバンドが検出された(図2、レーン2)。これは(1)で作製した抗血清が、NC1遺伝子産物を認識し、少なくともウェスタン法により検出することが可能であることを示すものである。

[0037] また、ヒト胎児神経組織から調製したneurosphereに対してウェスタン法を行ったところ、NC1遺伝子を強制発現させたJurkat-NC1と同じ位置に、抗血清と反応するバンドが検出された(図3)。さらに、Jurkat-NC1では細胞質画分、核画分双方に反応しているが、neurosphereでは細胞質画分にのみ反応性が認められた。したがって、この抗血清を用いたウェスタン法により、neurosphere等の神経幹細胞／前駆細胞におけるNC1遺伝子産物の存在を検出できる。また、この抗血清は、全細胞抽出液だけでなく分画した抽出液とも反応することから、NC1遺伝子産物の細胞内局在性を示すことも可能である。

産業上の利用可能性

[0038] 本発明のNC1遺伝子及びNC1タンパク質は、神経系の細胞の分化過程に関与していると考えられ、神経幹細胞／前駆細胞を検出、選別できる神経幹細胞マーカーとして応用できる。

図面の簡単な説明

[0039] [図1]ノーザン法によるNC1遺伝子の発現解析の結果を示す図である。NC1はNC1遺伝子由来mRNAの易動度に相当する位置を示す。

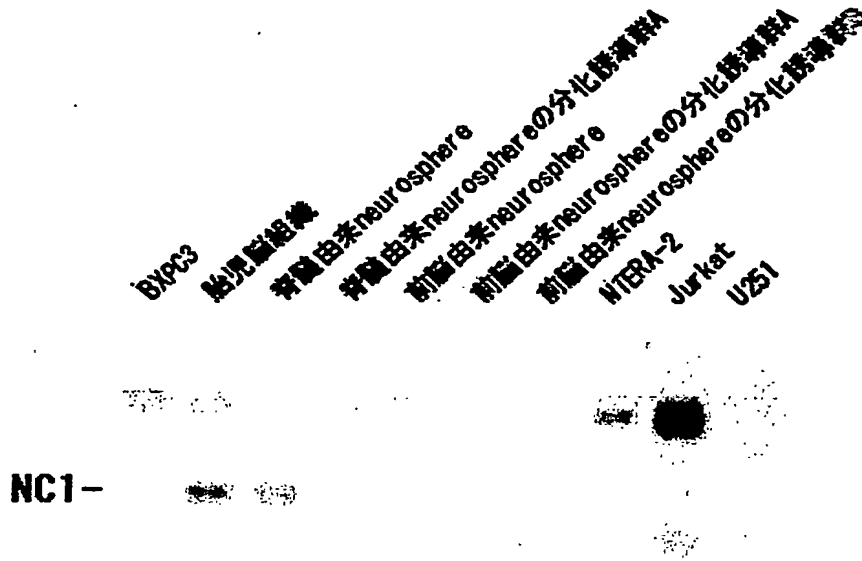
[図2]Jurkat細胞に強制発現させたNC1遺伝子産物をウェスタン法により検出した結果を示す図である。レーン1にはJurkat細胞由来の全RNAを、レーン2にはNC1遺伝子を強制発現させたJurkat細胞由来の全RNAを電気泳動した。

[図3]Jurkat細胞に強制発現させたNC1遺伝子産物及びneurosphereに存在するNC1遺伝子産物をウェスタン法により検出した結果を示す図である。レーン1、4には全細胞抽出液を、レーン2、5には細胞質画分を、レーン3、6には核画分を電気泳動した。

請求の範囲

- [1] 配列番号1に記載の塩基配列全部または一部を有するDNA。
- [2] 配列番号2または配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA。
- [3] 配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。
- [4] 配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。
- [5] 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するペプチド。
- [6] 請求項3～5のいずれかに記載のペプチドを抗原として得られた抗体。
- [7] 抗体の種類がポリクローナル抗体である請求項6に記載の抗体。
- [8] 抗体の種類がモノクローナル抗体である請求項6に記載の抗体。
- [9] 請求項1～2に記載のDNA、請求項3～5に記載のペプチド、及び請求項6～8に記載の抗体からなる群より選ばれる少なくとも1種を用いた神経幹細胞／前駆細胞の検出方法。
- [10] 請求項9に記載の検出方法を用いた、神経分化因子または神経分化抑制因子として機能する薬剤をスクリーニングする方法。

[図1]



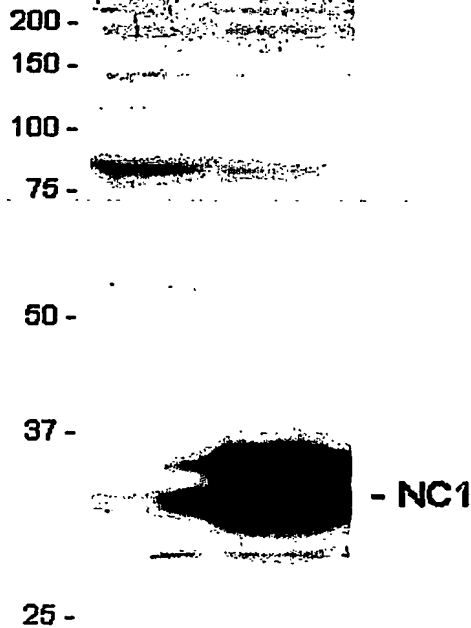
28S rRNA-



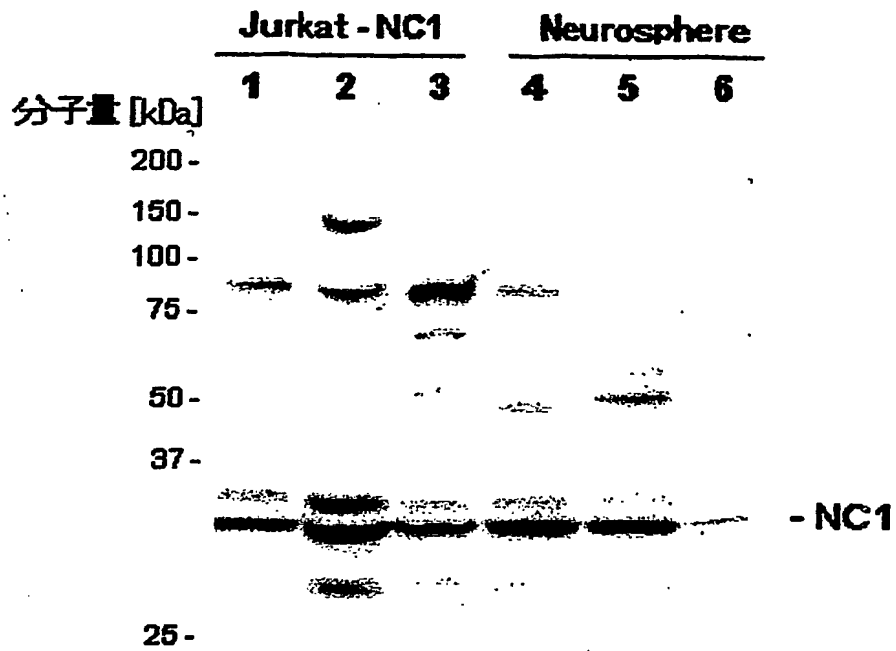
[図2]

分子量 [kDa]

1 2



[図3]



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 株式会社カネカ KANEKA CORPORATION

独立行政法人産業技術総合研究所 National Institute of Advanced
Industrial Science and Technology財団法人先端医療振興財団 Foundation for Biomedical Research and
Innovation

<120> 新規な神経幹細胞マーカー Novel neural stem cell marker

<130> B030361W001

<150> JP 2003-321564

<151> 2003-9-12

<160> 6

<210> 1

<211> 749

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NC1 probe

<400> 1

```

ggagcttggt aatgcagggtg gtgaaggagc aggttatgag agcaattaca accaagccta   60
gtccoctgga ccagttcaag agcaaaactgc agaacctgag ctacactgag atcctgaaaa  120
tccgccagtc cgagaggatg aaccagggaag atttccagtc ccgcccgatt ttggaactaa  180
aggagaagat tcagccagaa atcttagagc tgatcaaaca gcaacgcctg aaccgccttg  240
tggaagggac ctgctttagg aaactcaatg cccggcggag gcaagacaag ttttggtatt  300
gtcggctttc gccaaatcac aaagtcctgc attacggaga cttagaagag agtootcagg  360
gagaagtgcc ccacgattcc ttgcaggaca aactgcoggt ggcagatata aaagccgtgg  420
tgacgggaaa ggactgccct catatgaaag agaaagggtgc ctttaacaa aacaaggagg  480
tgcttgaact cgctttctcc atcttgtatg actcaaaactg ccaactgaac ttcacgctc  540
ctgacaagca tgagtactgt atctggacag atggactgaa tgcgctactc gggaaggaca  600
tgatgagcga cctgacgcgg aatgacctgg acacctgct cagcatggaa atcaagctcc  660
gcctoctgga cctggaaaac atccagatcc ctgaogcacc tccgccgatt cccaaggagc  720
ccagcaacta tgacttcgtc tatgactgt 749

```

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NC1 forward primer

2

<400> 2
ggagcttggt aatgcaggtg g 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NC1 reverse primer

<400> 3
acagtcatag acgaagtcata a 21

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NC1 epitope peptide

<400> 4
Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr Asp Phe Val Tyr
1 5 10 15
Asp Cys Asn

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NC1 epitope peptide

<400> 5
Cys Pro His Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val
1 5 10 15

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NC1 epitope peptide

<400> 6

3

Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asp Lys Phe Trp Tyr Cys
1 5 10 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/04, 1/68, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/04, 1/68, G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JICST)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Database GenBank accession No.BC003051, 12 July, 2001 (12.07.01), Strausberg, R.Homo sapiens, KIAA0281 gene product, clone MGC: 754 IMAGE: 3535846, mRNA, complete cds.	1-8/9-10
X/A	US 2003/0028904 A1 (Gumienny T.L., et al.), 06 February, 2003 (06.02.03), Particularly, SEQ ID NO: 5-6 (Family: none)	1-8/9-10
X/A	Gumienny T.L., et al., CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration., Cell, 2001, 107(1), pages 27 to 41	1-8/9-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December, 2004 (14.12.04)

Date of mailing of the international search report

28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013221

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/078631 A1 (Kaneka Corp.), 25 September, 2003 (25.09.03), Particularly, Sequence Nos. 1, 4 (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/04, 1/68, G01N33/15, 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/04, 1/68, G01N33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Database GenBank accession No. BC003051, July 12, 2001, Strausberg, R., Homo sapiens, KIAA0281 gene product, clone MGC:754 IMAGE:3535846, mRNA, complete cds.	1-8/9-10
X/A	US 2003/0028904 A1 (Gumienny T.L., et al.) 2003.02.06 特に, SEQ ID NO:5-6参照(ファミリーなし)	1-8/9-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.12.2004

国際調査報告の発送日

28.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Gumienny T.L., et al., CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. Cell, 2001, 107 (1), p. 27-41	1-8/9-10
PX	WO 03/078631 A1 (鐘淵化学工業株式会社) 2003. 09. 25 特に, 配列番号1, 4参照 (ファミリーなし)	1-8